

Influence d'un régime de malnutrition protéique (5 p. 100 de gluten) et d'une réalimentation équilibrée (15 p. 100 de caséine) sur les activités de la lipase potentielle, de la lipase-colipase dépendante et de la phospholipase A₂.

I. — Dans le pancréas de rat en croissance

par J. BELLEVILLE, M. BOUZIANE, Josiane PROST

*Laboratoire de Physiologie animale et de la Nutrition,
U. E. R. Nutrition, B. P. 138, 21004 Dijon cedex, France*

Summary. *Effect of a protein-deficient diet (5 p. 100 gluten) and of balanced refeeding (15 p. 100 casein) on potential lipase, colipase-dependent lipase and phospholipase A₂ activities. I. In the growing rat pancreas.*

The intake of a 5 p. 100 gluten diet as the only protein source caused an overall protein synthesis deficiency that immediately stopped the rat growth. At first, the pancreas was less affected than the rest of the organism, but after 29 days of malnutrition, there was a 40 p. 100 decrease in body and pancreatic weight. The protein level of the deficient pancreas remained at that of the controls. Refeeding caused a considerable but temporary increase in that level after 24 h. The specific enzyme activities (AS) showed high variations from one day to the other, but only phospholipase A₂ AS was significantly affected by the deficiency (— 50 p. 100). Total lipase activities of the pancreas were reduced by 50 p. 100 and those of phospholipase A₂ by 70 p. 100.

Refeeding caused a considerable increase in lipase activities in 12 h and in phospholipase A₂ activity in 48 h, but this process was brief and did not indicate complete recovery of those activities. After 27 days of refeeding, only phospholipase A₂ showed good levels.

Adding methionine to the deficient diet only changed the colipase level ; this constitutes one more argument in favor of a distinct synthesis for this factor and for lipase.

Introduction.

Vandermeers *et al.* (1964, 1966, 1967, 1968), Robberecht *et al.* (1967), ont étudié, au niveau du pancréas de rat, l'impact sur les synthèses de plusieurs enzymes digestives, d'un régime contenant 7 p. 100 de gluten comme seule source protéique.

Ces travaux ont donné des résultats intéressants, mais quelquefois contradictoires. Cependant, l'étude des activités enzymatiques n'a pas été faite d'une façon rapprochée au cours de la malnutrition et les effets de la réalimentation n'ont été étudiés que sur une courte période de 3 jours. De plus, l'activité lipasique n'a pas été dosée sous sa forme potentielle et colipasique dépendante.

La finalité de nos recherches étant de déterminer, chez l'enfant, le comportement des enzymes digestives pancréatiques lors de la malnutrition protéique et de la réali-

mentation, le régime utilisé par les auteurs précédents nous a paru particulièrement adapté à notre problème. En effet, dans les alimentations humaines à base de dérivés du blé, carencées en protéines, c'est le gluten la source majeure d'azote.

Nous avons utilisé le jeune rat comme matériel d'expérience, car il a la réputation d'être un bon modèle pour l'étude de la malnutrition humaine (Kirsch, Saunders et Brock, 1968 ; Heard *et al.*, 1977).

Dans une expérience, nous ajoutons de la méthionine au régime carencé, l'ajout de cet acide aminé ayant, d'après Pitchumoni (1973), les mêmes effets qu'un apport de caséine.

Techniques expérimentales.

Nous utilisons des rats mâles Wistar, qui pèsent 80 ± 10 g au début de l'expérimentation. Les animaux boivent et consomment leurs régimes à volonté.

Pendant 10 jours, tous les rats absorbent le régime à 15 p. 100 de caséine. Ils sont ensuite divisés en deux lots, l'un (témoin) continue de consommer le même régime durant 56 jours, l'autre (carencé) reçoit pendant 29 jours un régime à 5 p. 100 de gluten. Ce dernier lot est ensuite partagé en deux, une moitié reçoit à nouveau le régime équilibré pendant 27 jours, l'autre moitié continue de recevoir, pendant le même temps, le régime à 5 p. 100 de gluten auquel on ajoute 0,6 p. 100 de méthionine (carencé + méthionine).

TABLEAU I
Composition des régimes
(en pourcentages pondéraux et énergétiques)

Régimes	Témoin			Carencé			Carencé + Méthionine		
	p. 100 pondéral	p. 100 énergétique	kJ/100 g	p. 100 pondéral	p. 100 énergétique	kJ/100 g	p. 100 pondéral	p. 100 énergétique	kJ/100 g
Caséine lactique.	15	15	251	—	—	—	—	—	—
Gluten	—	—	—	5	5	84	5	5	84
Méthionine (Merck)	—	—	—	—	—	—	0,6	0,61	10
Amidon	60	67	1 105	70	77	1 272	69,4	76,4	1 264
Saccharose (sucre cristallisé).	6			6			6		
Huile de tournesol (origine commerciale)	8	18	301	8	18	301	8	18	301
Agar-Agar	5	—	—	5	—	—	5	—	—
Mélange salin (extralabo)	4	—	—	4	—	—	4	—	—
Complexe vitaminique (extralabo)	2	—	—	2	—	—	2	—	—

Le tableau 1 présente la composition des régimes en pourcentages pondéraux et énergétiques.

Les 3 régimes utilisés sont isoénergétiques et isolipidiques.

Tous les 2 à 3 jours, avec 3 rats pour chaque régime, nous réalisons des pools de 3 pancréas. Ceux-ci sont prélevés sur des animaux toujours sacrifiés à la même heure, par rupture des vertèbres cervicales. Les pancréas sont rapidement prélevés et pesés. Ils sont broyés à froid dans de l'eau distillée (1 ml/100 mg de tissu). Ces broyats sont conservés sous forme de parties aliquotes, à -18°C en attendant les dosages.

Les protéines sont mesurées selon la technique de Lowry *et al.* (1951). Les dosages enzymatiques sont réalisés par titrimétrie à l'aide d'un pHstat Radiometer. Les activités lipasiques sont dosées sur un substrat de tributyrine, en l'absence de sels biliaires pour la lipase potentielle, en leur présence pour la lipase-colipase dépendante (Borgström et Hildebrand, 1975). Le dosage de l'activité phospholipasique A_2 utilise des phospholipides purifiés d'œuf comme substrat (Belleville et Clément, 1971).

Résultats.

I. — Poids des animaux et des pancréas (fig. 1 et 2A).

La malnutrition protéique entraîne un arrêt immédiat de la croissance, le poids des animaux va même diminuer. Par contre, les 8 premiers jours, le poids des pan-

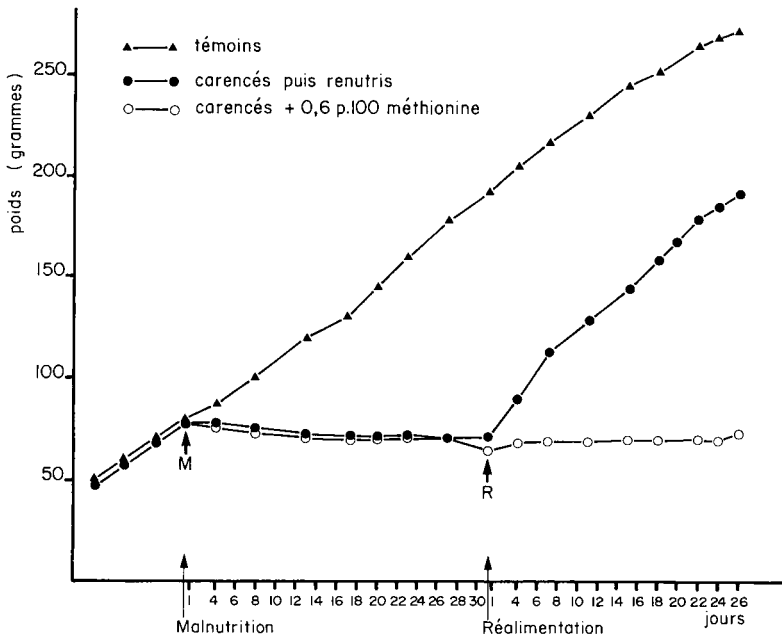


FIG. 1. — Courbes de croissance pondérale des animaux. Avant le début de la période de malnutrition (M), tous les animaux consomment pendant 10 jours le régime témoin. R : signale le début de la réalimentation pour les animaux renutris ou l'ajout de méthionine pour les animaux carencés + méthionine.

créas continue d'augmenter. Après 29 jours de malnutrition, le poids des animaux carencés ne représente que 40 p. 100 de celui des témoins et leurs pancréas 47 p. 100.

Après réalimentation équilibrée, la croissance reprend immédiatement chez les renutris. Elle est alors plus intense que celle des témoins et la croissance des pancréas est proportionnellement supérieure à celle du corps.

A la fin de la période de réalimentation, les animaux carencés conservent un déficit de 24 p. 100 par rapport aux témoins, aussi bien au niveau du poids de l'organisme que du pancréas.

L'enrichissement du régime carencé avec de la méthionine n'entraîne pas de récupération et pour ces animaux, à la fin de l'expérience, le déficit pondéral du corps et de la glande est de 76 p. 100, comparé aux valeurs témoins.

II. — Protéines du pancréas (fig. 2B et C).

A la fin de la période de malnutrition, chez les animaux carencés, les quantités de protéines/pancréas représentent 57 p. 100 de celles des témoins. La renutrition au début ne modifie pas de façon importante ces valeurs, mais elle les augmente en fin d'expérience. Chez les animaux au régime carencé supplémenté en méthionine, ces valeurs continuent de diminuer par rapport à la fin de la malnutrition.

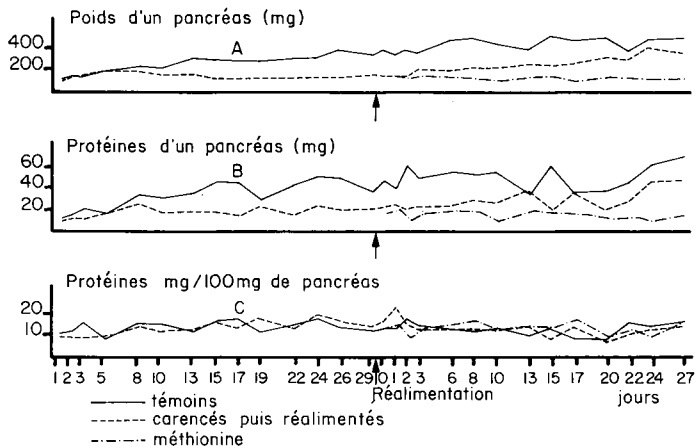


FIG. 2. — La flèche indique la fin de la période de malnutrition et le début de la réalimentation équilibrée pour les renutris et le début de l'ajout de méthionine pour les carencés + méthionine. 0 = 12 h de réalimentation.

Les quantités de protéines/100 mg de pancréas donnent en moyenne des chiffres voisins chez les témoins et les carencés, il en est de même avec les 3 régimes, lors de la période de réalimentation.

Il existe cependant chez les renutris, après 24 h de réalimentation, une importante mais fugace augmentation de la teneur en protéines du pancréas (+ 80 p. 100 par rapport aux témoins).

III. — Activités lipasique potentielle, lipasique-colipasique dépendante, phospholipasique A₂ (fig. 3 et 4).

1) *Durant la malnutrition.* — L'analyse des diagrammes nous conduit à faire deux remarques générales :

— La malnutrition n'entraîne pas une chute progressivement croissante des activités enzymatiques en fonction de sa durée. De la même façon, la réalimentation n'entraîne pas un retour progressif vers les valeurs témoins.

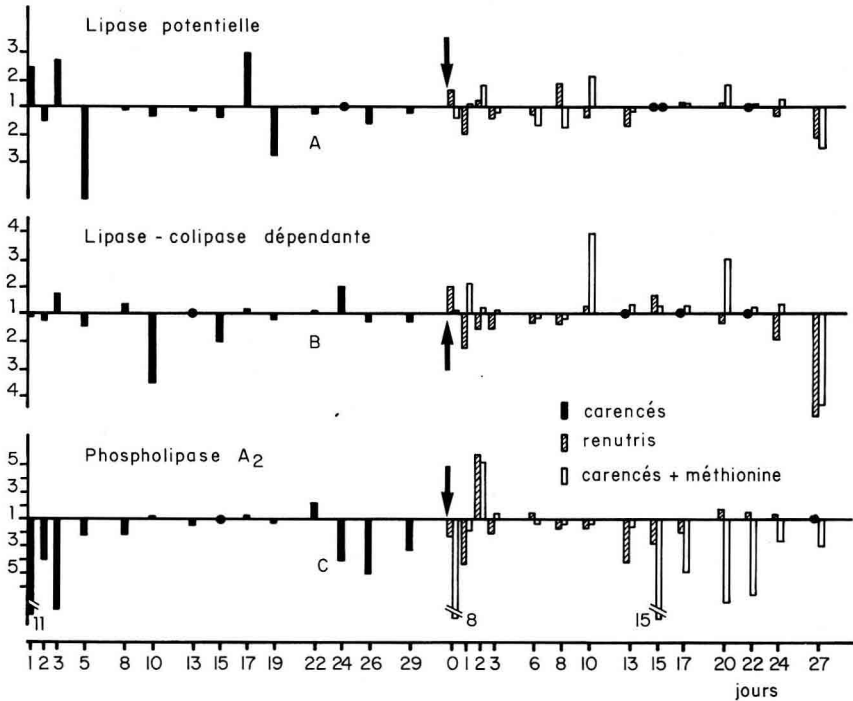


FIG. 3. — Les activités spécifiques sont données par le nombre de μEq de substrat hydrolysés/min/mg de protéine.

La flèche indique la fin de la période de malnutrition et le début de la réalimentation équilibrée pour les renutris et le début de l'ajout de méthionine pour les carencés + méthionine. 0 = 12 h de réalimentation. La ligne qui marque la base des diagrammes correspond à la valeur obtenue chez les témoins, elle est égale à 1. Les diagrammes expriment les valeurs expérimentales trouvées chez les animaux carencés, renutris ou carencés + méthionine, en fonction des valeurs témoins. Les chiffres placés en ordonnées donnent la valeur de X.

— Lorsque le diagramme est situé au-dessus de la ligne de base, ils indiquent que la valeur expérimentale est égale à X fois plus la valeur témoin.

— Lorsque le diagramme est situé en dessous de la ligne de base, ils indiquent que la valeur expérimentale est égale à X fois moins la valeur témoin.

Donc, plus le diagramme est élevé au-dessus de la ligne de base, plus la valeur trouvée est supérieure à la valeur témoin et plus la valeur est importante en dessous de la ligne de base, plus la valeur obtenue est inférieure à la valeur témoin.

Quand il existe un point sur la ligne de base, cela signifie que la valeur trouvée est semblable à celle des témoins.

— Les effets observés au niveau des activités ne sont pas synchrones d'une enzyme à l'autre.

a) *Activités spécifiques (AS)* (fig. 3). — Après 24 h de malnutrition, l'AS de la lipase potentielle est stimulée ($\times 2,5$), celle de la lipase-colipase dépendante est peu modifiée et celle de la phospholipase A_2 est fortement inhibée ($- 11$ fois). Puis, au cours de la malnutrition, ces AS, pour chacune des enzymes, vont montrer de grandes différences d'un dosage à l'autre. Les moyennes des AS qui masquent ces variations quotidiennes, donnent des valeurs voisines pour les témoins et les carencés pour les deux activités lipasiques et une diminution ($- 2,7$ fois) pour la phospholipase A_2 chez les malnutris.

Il est intéressant de noter qu'en fin de période de malnutrition, les AS des deux activités lipasiques sont un peu plus faibles que les valeurs témoins, tandis que l'AS de la phospholipase A_2 est inférieure de 3,5 fois à celle des témoins.

b) *Activités totales (AT)* (fig. 4). — Les résultats sont plus homogènes en raison de

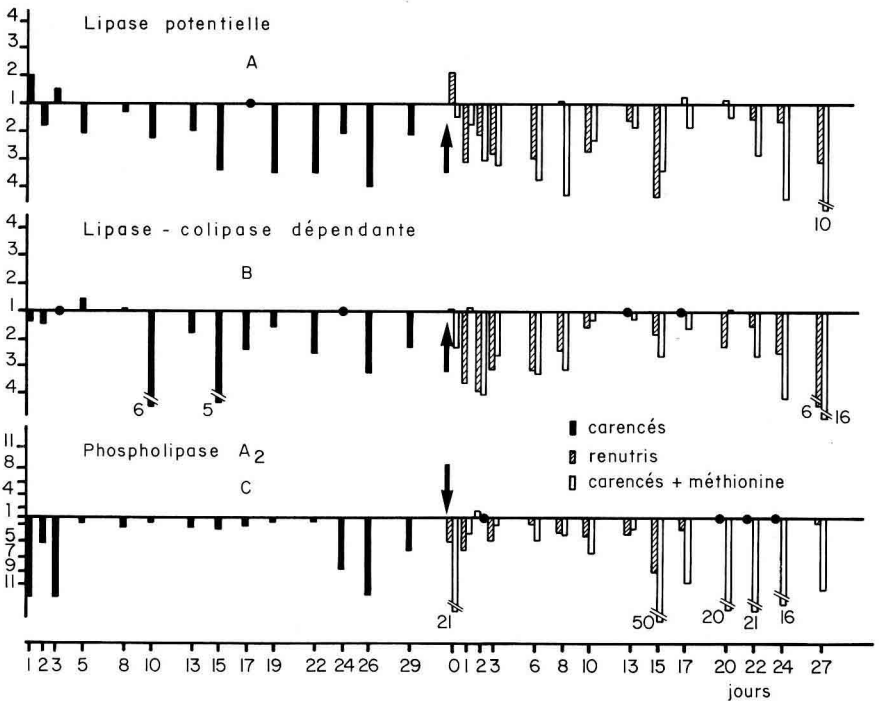


FIG. 4. — Les activités totales sont obtenues en multipliant l'activité spécifique d'une enzyme par la quantité totale de protéines d'un pancréas. Légendes (voir fig. 3).

l'importante chute de poids des pancréas carencés. Nous constatons la bonne résistance de l'AT de la lipase-colipase dépendante jusqu'au 8^e jour de malnutrition et celle de la phospholipase A_2 du 5^e au 22^e jour avec, pour cette dernière, une diminution importante en début et en fin de malnutrition. Nous pouvons remarquer que la

malnutrition, pour aucune des 3 enzymes, ne se termine par une disparition des activités.

2) *Durant la réalimentation.*

a) *Activités spécifiques* (fig. 3). — Après 12 h de réalimentation équilibrée, il existe une stimulation des AS de la lipase potentielle et de la lipase-colipase dépendante qui deviennent alors supérieures à celles des témoins.

Bien que cette stimulation existe pour la phospholipase A_2 , elle reste inférieure à celle des témoins ; par contre, pour cette enzyme, il existe une puissante stimulation le 2^e jour de réalimentation.

Pour les 3 activités enzymatiques, il existe, 24 h après le début de la réalimentation, une importante diminution des AS. Puis, au cours de la réalimentation, pour les activités lipasiques, les valeurs vont devenir proches des valeurs témoins, jusqu'au 22^e jour de renutrition. A la fin de celle-ci, il y aura une nouvelle altération de ces AS par rapport à celles des témoins, plus importantes pour la lipase-colipase dépendante que pour la lipase potentielle. La phase de réalimentation, pour la phospholipase A_2 , se termine par un retour aux valeurs témoins. Les moyennes confirment ces résultats pour les 3 activités enzymatiques, elles sont proches des valeurs témoins pour l'ensemble de la période de réalimentation.

L'ajout de méthionine au régime carencé n'entraîne pas la récupération de l'AS de la phospholipase A_2 (— 3,6 fois en moyenne), mais il augmente davantage l'AS de la lipase-colipase dépendante que la renutrition équilibrée, cela n'est pas vrai pour la lipase potentielle.

b) *Activités totales* (fig. 4). — Seule, l'AT de la lipase potentielle reste nettement stimulée après 12 h de réalimentation. Mais, sur l'ensemble de la période, les 3 AT restent inférieures à celles des témoins, en moyenne — 1,5 fois pour la lipase potentielle, — 3,5 fois pour la lipase-colipase dépendante et — 2,8 fois pour la phospholipase A_2 .

Cependant, en fin de malnutrition, l'AT de la phospholipase A_2 est revenue à la normale.

L'ajout de méthionine au régime carencé n'améliore pas les AT des enzymes par rapport à ce qui se produit pendant la carence pure, au contraire, il les diminue davantage.

Discussion, conclusion.

Le régime témoin contenant 15 p. 100 de caséine assure une croissance normale des rats, malgré sa teneur limite en méthionine. Le régime à 5 p. 100 de gluten, particulièrement pauvre en lysine, entraîne un arrêt immédiat de la croissance, dû à un déficit global des synthèses protéiques. Au cours de la 1^{re} période, la croissance du pancréas chez les témoins est proportionnellement plus importante que celle du corps, le poids relatif de la glande augmente donc ; ce phénomène, bien qu'atténué, persiste avec le régime gluten. Celui-ci, donné pendant 8 jours, entraîne sur cette durée une chute de poids corporel de 16 p. 100 mais seulement de 5 p. 100 pour le pancréas. Donc, au début de la carence, la glande est mieux protégée que le reste de l'organisme ; cet effet ne persistera pas puisqu'après 29 jours de carence, les poids

de l'animal et du pancréas seront inférieurs de 42 p. 100 à ceux des témoins. Au début de la renutrition, le pancréas a une croissance pondérale supérieure à celle du corps, ce qu'avaient déjà montré Vandermeers et Christophe (1964), mais cet effet ne persiste pas.

Les quantités de protéines/pancréas croissent plus rapidement que le poids du pancréas chez les témoins et les carencés, il en est de même au début de la renutrition. L'ajout de méthionine au régime carencé ne permet aucune récupération au niveau des poids de l'animal et du pancréas et de la quantité de protéines/pancréas, donc pour ces paramètres, cet acide aminé n'est pas le facteur limitant.

Les teneurs en protéines des pancréas donnent des chiffres voisins chez les témoins et les carencés ; cela signifie que, si le régime gluten a un effet drastique sur le poids de la glande, il maintient cependant sa richesse en protéines. La renutrition ne modifie pas ces données en dehors d'une importante mais fugace augmentation de la teneur en protéines après 24 h (+ 80 p. 100/témoins) constatée déjà par Vandermeers et Christophe (1964), mais ces auteurs ne notent pas la brièveté du phénomène. Cette stimulation particulière n'est pas corrélée avec une augmentation du même ordre de l'ADN ou de l'ARN dans la glande, elle provient donc d'une optimisation des processus de synthèse non perturbés irréversiblement par la carence.

Les AS des enzymes montrent des variations considérables d'un jour à l'autre avec tous les régimes mais sans synchronisme pour les 3 activités étudiées. Cela peut s'expliquer par des différences individuelles considérables qui persisteraient malgré la réunion de 3 pancréas pour chaque dosage ; cela peut aussi signifier la présence de rythmes de synthèse qui auraient d'importantes amplitudes et qui ne seraient pas synchrones du nyctémère. Les moyennes des AS, qui masquent ces variations, ne donnent pas de différences significatives entre les carencés et les témoins pour les 2 activités lipasiques ; par contre, l'activité phospholipasique est diminuée de 50 p. 100 chez les carencés, elle est donc plus sensible à la carence que la lipase ou la colipase.

Les activités totales/pancréas, qui sont diminuées de 45 à 50 p. 100 pour les activités lipasiques, sont donc dues à la chute de la synthèse de ces enzymes mais non à une diminution de leur activité. Pour la phospholipase A_2 , les 2 phénomènes s'associant, les activités totales sont diminuées en moyenne de 70 p. 100.

La renutrition entraîne pour les 3 activités enzymatiques un important phénomène de rebond qui indique que les potentialités de synthèses persistent. Cependant, le phénomène n'a pas lieu au même moment, dès les premières 12 h pour la lipase et la colipase, après 48 h pour la phospholipase. Ceci avait déjà été vu par Vandermeers *et al.* (1966, 1967) mais cet effet est fugace et ne prouve en aucune façon la récupération complète des activités au niveau du pancréas, puisque celles-ci restent très inférieures aux témoins par la suite pour les activités lipasiques et il faudra attendre le 20^e jour de réalimentation pour voir la récupération complète de l'activité de la phospholipase A_2 .

L'ajout de méthionine au régime carencé n'a d'importance que dans le cas de la colipase ; cela est un argument de plus en faveur d'une synthèse distincte de ce facteur et de la lipase.

Références

- BELLEVILLE J., CLÉMENT J., 1971. Effets de facteurs nutritionnels et hormonaux sur l'activité phospholipasique A₂ du suc pancréatique chez le rat éveillé. *Arch. Sci. physiol.*, **25**, 59-83.
- BORGSTRÖM B., HILDEBRAND H., 1975. Lipase and co-lipase activities of human small intestinal contents after a liquid test meal. *Scand. J. Gastroent.*, **10**, 585-591.
- HEARD C. R. C., FRANGI S. M., WRIGHT P. M., Mc CARTNEY P. R., 1977. Biochemical characteristics of different forms of protein-energy malnutrition : an experimental model using young rats. *Br. J. Nutr.*, **37**, 1-21.
- KIRSCH R. E., SAUNDERS S. J., BROCK J. F., 1968. Animal models and human protein calorie malnutrition. *Am. J. clin. Nutr.*, **21**, 1225-1228.
- LOWRY O. H., ROSENBOUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R. J., 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. biol. Chim.*, **193**, 265-275.
- PITCHUMONI C. S., 1973. Pancreas in primary malnutrition disorders. *Am. J. clin. Nutr.*, **26**, 374-379.
- ROBBERECHT P., VANDERMEERS A., KHAYAT M. H., RATHE J., CHRISTOPHE J., 1967. Synthèse et excrétion des hydrolases pancréatiques chez le rat dont la malnutrition protéidique prend fin. *Bull. Soc. chim. biol.*, **49**, 1735-1750.
- VANDERMEERS A., CHRISTOPHE J., 1964. Influence d'une carence en lysine sur le pancréas de rat. *Arch. int. Physiol. Biochim.*, **72**, 701-703.
- VANDERMEERS A., ROBBERECHT P., RATHE J., CHRISTOPHE J., 1966. Influence d'une carence en lysine sur le contenu en hydrolases du pancréas et de l'intestin grêle du rat. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **48**, 133-153.
- VANDERMEERS A., KHAYAT M. H., RATHE J., CHRISTOPHE J., 1967. Effets d'une carence en lysine et thréonine sur le « turnover » de 5 enzymes exocrines du pancréas. *Arch. int. Physiol. Biochim.*, **75**, 900-902.
- VANDERMEERS A., KHAYAT M. H., RATHE J., CHRISTOPHE J., 1968. Vies moyennes de 5 hydrolases dans le pancréas du rat normal ou en malnutrition protéidique. *Biochim. biophys. Acta*, **158**, 448-455.
-